

Estudio al M.E.B. de larvas plerocercoides de *Phyllobothrium* sp. (Tetraphyllidea, Phyllobothriidae) y *Nybelinia lingualis* (Trypanorhyncha, Tentaculariidae), cestodos parásitos de *Octopus vulgaris* (Mollusca, Cephalopoda) en la Ría de Vigo

S.E.M. study of the plerocercoid larval *Phyllobothrium* sp. (Tetraphyllidea, Phyllobothriidae) and *Nybelinia lingualis* (Trypanorhyncha, Tentaculariidae), cestode parasite in *Octopus vulgaris* (Mollusca, Cephalopoda) off Vigo estuary

Camino GESTAL, Elvira ABOLLO, Cristina ARIAS y Santiago PASCUAL*

Recibido el 13-XII-1996. Aceptado el 18-IV-1997

RESUMEN

En el presente trabajo se realiza la identificación taxonómica de plerocercoides tetrafilídeos (*Phyllobothrium* sp.) y tripanorinquídeos (*Nybelinia lingualis*), cestodos parásitos en el tracto digestivo del pulpo *Octopus vulgaris* en aguas de Galicia. Desde el punto de vista biosistemático estas dos citas amplían el rango hospedador de *Phyllobothrium* sp. y constituye el primer registro de un representante de la familia Tentaculariidae en *O. vulgaris* en aguas atlánticas de la Península Ibérica. La utilización de técnicas de M.E.B. proporciona, además, una información adicional, necesaria para la revisión de los caracteres taxonómicos y la correcta descripción anatómica de las formas larvales del género *Phyllobothrium* previamente descritas mediante estudios a microscopía óptica.

ABSTRACT

This paper deals the taxonomic identification of tetraphyllidean (*Phyllobothrium* sp.) and tripanorhynchidean (*Nybelinia lingualis*) plerocercoids cestode parasites in the digestive tract of the common octopus *Octopus vulgaris* in waters of Galicia. Concerning the biosystematic, this paper widens the host range of *Phyllobothrium* sp. and represents the first record of a Tentaculariidae in *O. vulgaris* in Ibero-Atlantic waters. S. E. M. techniques made it possible to obtain additional microtopographic, morphoanatomical and morphometric information, which is needed for the review of taxonomic characters and for the correct anatomical description of the larval stages of *Phyllobothrium* already described by light microscopy.

PALABRAS CLAVE: *Phyllobothrium* sp., *Nybelinia lingualis*, cestodo, plerocercoides, *Octopus vulgaris*, M.E.B.
KEY WORDS: *Phyllobothrium* sp., *Nybelinia lingualis*, cestode, plerocercoid, *Octopus vulgaris*, S.E.M.

* Laboratorio de Parasitología. Facultad de Ciencias del Mar. Universidad de Vigo. Apdo. 874, Vigo, España.

INTRODUCCIÓN

El pulpo común, *Octopus vulgaris* Cuvier 1797, es una de las especies con más amplia trayectoria en la historia de la explotación pesquera de cefalópodos (BOYLE, 1890). A pesar de su indudable importancia económica (más de 15.000 toneladas anuales en España: FAO, 1994), de su importante papel en la cadena trófica del ecosistema marino y de su amplia utilización como modelo experimental en investigaciones biomédicas (HANLON Y FORSYTHE, 1985; GUERRA, 1992), la información disponible sobre el papel de *O. vulgaris* como reservorio de parásitos y sobre los distintos agentes etiológicos de naturaleza infecciosa presentes en las poblaciones naturales de octópodos resulta todavía claramente insuficiente (PASCUAL Y GUERRA, en prensa). PASCUAL, GESTAL, SOTO, ABOLLO, RODRÍGUEZ, ESTÉVEZ Y ARIAS (1996) señalan la importancia de los octópodos como hospedadores intermediarios, definitivos y/o paraténicos en los ciclos biológicos monoxenos y/o heteroxenos de una gran variedad de taxones parásitos en distintas regiones faunísticas. La práctica totalidad de los trabajos de investigación biosistemática sobre parásitos de cefalópodos en las regiones "Western Mediterranean Sea" y "Western Mediterranean Outflow" (áreas biogeográficas definidas por BACKUS, HAEDRICH Y ROBINSON, 1977) se realizaron durante los años 30 y 40 (ver HOCHBERG, 1990). La incorporación de nuevas técnicas de Microscopía Electrónica de Barrido (M.E.B.) (MAYR, 1969), ha hecho posible el estudio de la microtopografía y la revisión y comparación de los caracteres morfoanatómicos y morfométricos de dos especies de cestodos parásitos previamente descritas en microscopía óptica.

Una cuestión de central interés en la biología es el conocimiento morfológico y taxonómico de los organismos vivos. La aplicación de las técnicas de M.E.B. se ha convertido en los últimos años en una herramienta importante e imprescindible para el correcto estudio morfológico y taxonómico de todos los

taxones parásitos sin excepción, revelándose especialmente útil en la diferenciación de especies morfológicamente próximas e, incluso, de especies crípticas no fácilmente diferenciables a M. O.

El elevado poder de aumentos y la visión tridimensional obtenida en las microfotografías a M.E.B. ha permitido así, conocer las relaciones espaciales de las estructuras superficiales de un gran número de taxones parásitos y su validez como importantes caracteres de diagnóstico.

Hasta la fecha, no existía en la literatura ningún trabajo previo sobre el estudio a M.E.B. de los parásitos de cefalópodos, a pesar de que en la última revisión publicada sobre la parasitofauna de cefalópodos (ver HOCHBERG, 1990) se alude constantemente a la gran cantidad de problemas taxonómicos debido a la ausencia de descripciones morfoanatómicas detalladas.

El estudio a M.E.B. proporciona una combinación de nitidez, claridad óptica, profundidad de campo, resolución y grandes aumentos, necesarios para la identificación y examen de la morfología y microtopografía de los estadios larvarios de cestodos descrito en este trabajo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Durante Diciembre de 1994 a Diciembre de 1995 se capturaron mediante aparejos artesanales en la Ría de Vigo (NO España: 8° 48' W, 42° 15' N) un total de 100 post-reclutas del pulpo *O. vulgaris* Cuvier 1797, con una longitud dorsal del manto (LDM) entre 100–250 mm y un peso total corporal comprendido entre 320–2460 g.

Para el aislamiento de los cestodos parásitos se procedió en el laboratorio a la disección ventral y necropsia completa de los individuos hospedadores seguido de un detallado examen macroscópico de las vísceras bajo estereomicroscopio, siguiendo los métodos estándar de autopsia helmintológica.

Tabla I. Caracteres biométricos analizados en larvas plerocercoides de *Phyllobothrium* sp. (Medias, rangos entre paréntesis, n=3).

Table I. Studied biometric features in plerocercoids larvae of *Phyllobothrium* sp. (Mean values, range in brackets, n= 3).

Longitud corporal	6387,8 µm	(5865–6762)
Longitud del escólex	659,8 µm	(460,6–784)
Longitud botridial	650,1 µm	(588–695,8)
Anchura máxima corporal	1277,9 µm	(1173–1377)
Diámetro máximo de la ventosa botridial	225,4 µm	(205,8–245)
Diámetro máximo de la ventosa apical	199,2 µm	(196–205,8)

Después del conteo total del número de parásitos/individuo hospedador, se siguió la metodología de QUINTEIRO (1990) y PASCUAL (1996) para el procesamiento y observación de los parásitos a M.E.B.:

Lavado en tampón cacodilato sódico 0,1 M pH 7,3–7,4 durante un periodo comprendido entre 30 minutos y 12 horas a 4°C, fijación en glutaraldehído (2,5%) en tampón cacodilato sódico durante 4 horas, deshidratación en series de etanol, sonicación (vibraciones de 70W durante 3 minutos varias veces)

y deshidratación con CO₂ a punto crítico en un Polaron E3000. Finalmente la metalización se llevó a cabo con una película de oro de 200Å de espesor en presencia de Argón durante 3 minutos en un Polaron Sc500, y se observaron en un microscopio Philips XS-30 a un voltaje de 5–12 kV.

Los valores demográficos de infestación (prevalencia, P; intensidad media, I; y abundancia, A) se calcularon de acuerdo con las recomendaciones de MARGOLIS, ESCH, HOLMES, KURIS Y SCHAD (1982).

RESULTADOS

Phylum PLATYHELMINTHES

Clase CESTOIDEA Rudolphi, 1809

Subclase EUCESTODA Southwell, 1930

Orden TETRAPHYLLIDEA Carus, 1863

Familia PHYLLOBOTHRIIDAE Brawn, 1900

Género *Phyllobothrium* Linton, 1922

Phyllobothrium sp. Linton, 1922 (Figs. 1-4)

Descripción larva plerocercoides: *Pars bothridialis* con escólex no armado, formado por cuatro grandes botridios (BO) plegados, ondulados, con una ventosa accesoria cada uno, ventosa botridial (VB), y una ventosa apical (VA). La *pars bothridialis* se continúa posteriormente por la *pars proliferus* (PP) o región de crecimiento. La *pars proliferus* se continúa con la *pars postica* o tallo larval, una región traslúcida gene-

ralmente más larga que la precedente. Los caracteres biométricos analizados se muestran en la Tabla I.

Localización y prevalencia: Un total de 3 de los 100 hospedadores analizados estaban parasitados por cestodos del género *Phyllobothrium*. Las formas parásitas halladas en *O. vulgaris* son, como en el resto de los hospedadores cefalópodos ibero-atlánticos, estadíos larvales

Tabla II. Caracteres biométricos analizados en larvas plerocercoides de *Nybelinia lingualis* (Medias, n=3).Table II. Studied biometric features in plerocercoids larvae of *Nybelinia lingualis* (Mean values, n= 3).

longitud total corporal	1940,4 µm	<i>pars bothridialis</i>	1127 µm
anchura máxima corporal	1147,5 µm	<i>pars bulbosa</i>	882 µm
longitud máxima botridio	1127 µm	<i>pars proliferus</i>	147 µm
anchura máxima botridio	5390 µm	longitud filas ganchos	40,98 µm
longitud velum	539 µm	nº filas transv. ganchos/trompa	38
longitud trompa	1274 µm	nº ganchos en cada espiral	6
anchura máxima trompa	40 µm	longitud intervalo entre filas	1,64 µm

plerocercoides. Los plerocercoides de *Phyllobothrium* sp. parasitan el intestino (66,66%) y ciego (33,33%) del hospedador, aunque en algún caso también se han encontrado individuos libres en la cavidad paleal debido a la activa migración post-mortem de estos parásitos.

Los valores demográficos de infestación fueron: P= 3%; I= 1; A= 0,03.

Los ejemplares Voucher han sido depositados en el "Department of Invertebrate Zoology, Santa Barbara Museum of Natural History" (SBMNH 143035; 143057).

Orden TRYPANORHYNCHA Diesing, 1863

Suborden ACYSTIDEA Guiart, 1927

Familia TENTACULARIIDAE Poche, 1926

Género *Nybelinia* Poche, 1926

Nybelinia lingualis Cuvier, 1817 (Figs. 5-8)

Descripción larva plerocercoides: La parte anterior, *pars bothridialis*, presenta 4 botridios (BO) sésiles y con bordes libres. El pedúnculo cefálico, más o menos cilíndrico, forma en la parte posterior un *velum* circular, bordeando la abertura de una amplia cavidad donde se aloja el apéndice.

En el extremo final del apéndice se aprecia un poro excretor. El escólex está invaginado y presenta 4 orificios, 2 dorsales y 2 ventrales, por donde salen 4

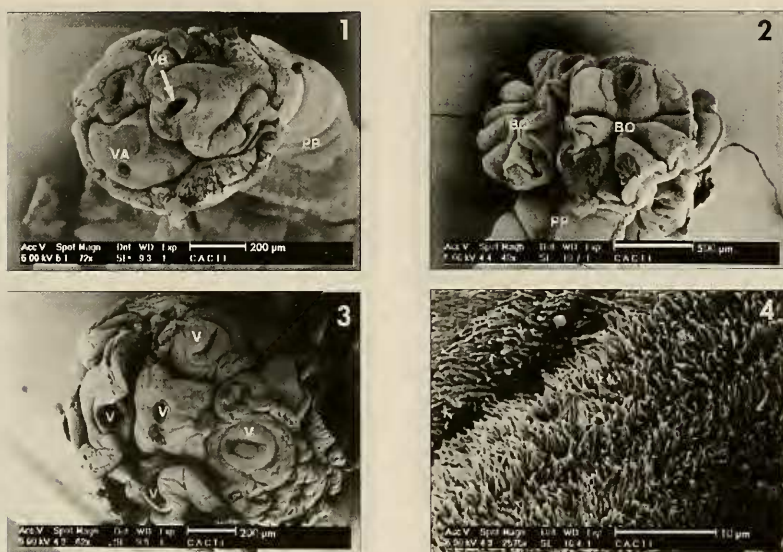
trompas (TR) armadas con ganchos dispuestos en espiral (G) o helicoidalmente. Los caracteres biométricos analizados en el total de ejemplares encontrados (n=3) se muestran en la Tabla II.

Localización y prevalencia: Se encontraron un total de 3 plerocercoides en el buche (33,33%), estómago (33,33%) y ciego (33,33%) en 3 ejemplares de *O. vulgaris*. Los valores demográficos de infestación fueron: P= 3%; I= 1; A= 0,03.

DISCUSIÓN

Aunque las formas adultas de cestodos nunca han sido descritas ni en *O. vulgaris* ni en cualquier otro cefalópodo (HOCHBERG, 1990), sí se han identificado el segundo y tercer estadio larvario. Los cefalópodos juegan un papel importante en el desarrollo del ciclo biológico de cestodos tetrafilídeos y tripanorrinquídeos

(STUNKARD, 1977), actuando como hospedadores intermediarios o paraténicos. Los hospedadores definitivos son elasmobranquios, (tiburones, rayas y quimeras), y la transmisión de los distintos estadios larvales infestantes a los hospedadores definitivos se realiza a través de las relaciones tróficas entre estos organismos.



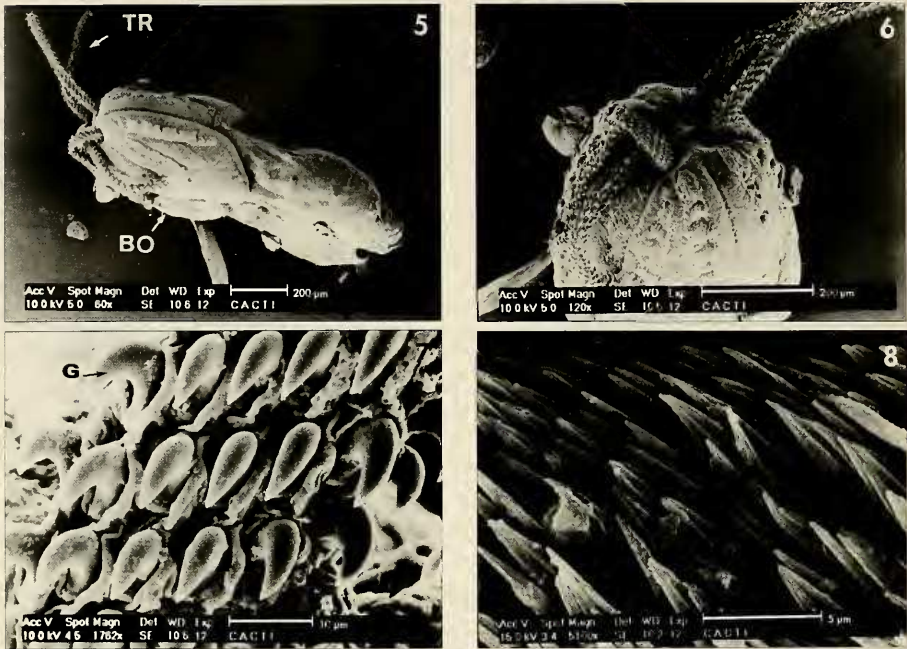
Figuras 1-4. Microfotografías al M.E.B. de *Phyllobothrium* sp. 1-3: variabilidad morfológica del escólex; 4: cubierta de microvelosidades (microtricas) en una región próxima al margen de los botridios. Abreviaturas: BO, botridio; V, ventosa; VA, ventosa apical; VB, ventosa botridial; PP: pars proliferus.

Figures 1-4. S.E.M. microphotographs of *Phyllobothrium* sp. 1-3: morphological variability of the scolex; 4: microvilli coverage in a region close to the edge of the botridia. Abreviaturas, BO: botridium; V: sucker; VA: apical sucker; VB, botridial sucker; PP: pars proliferus.

Los cetodos en estadio larval más comúnmente representados en el tracto digestivo de cefalópodos pertenecen a los órdenes Tetraphyllidea y Trypanorhyncha. Los plerocercoides de *O. vulgaris* se localizan en el ciego, buche, estómago e intestino. No obstante, ya que el órgano parasitado se diagnostica mediante necropsias post-mortem, algunas de estas larvas también se han encontrado libres migrando activamente en la cavidad del manto.

Hasta la fecha se han descrito una gran variedad de estadios larvarios y post-larvarios de cestodos tetrafilídeos y tripanorinquídeos en un total de 6 especies del género *Octopus* distribuidas por el Océano Pacífico, Atlántico occidental y Mar Mediterráneo. Los géneros *Phyllobothrium* y *Nybelinia* han sido ya descritos previamente como parásitos de *O. vulgaris* en el Mediterráneo y el Atlántico, en Francia e Italia (EUZET, 1959;

CUÉNOT, 1927; RUDOLPHI, 1819; VAULLEGEARD, 1899, 1901; DOLLFUS, 1936, 1958, 1964). Asimismo, también se han diagnosticado otras formas larvales del estadio plerocercoides de *Phyllobothrium* spp. en una amplia diversidad de cefalópodos teutoideos, octópodos y sepioideos en los Océanos Atlántico e Índico. En Galicia, PASCUAL, GESTAL, ESTÉVEZ, RODRÍGUEZ, SOTO, ABOLLO Y ARIAS (1996) han descrito plerocercoides de *Phyllobothrium* en varias especies comerciales de cefalópodos, y QUINTEIRO (1990) en 6 especies de teleósteos capturados en las Rías de Muros y Noya. Este último autor ha descrito también un total de 8 registros hospedadores del estadio plerocercoides de *N. lingualis* en especies comerciales de teleósteos, y PASCUAL, ARIAS Y GUERRA (en prensa) también han identificado *N. lingualis* como primera cita en el omastréfido *Todaropsis eblanae* Ball 1841 en aguas de Galicia, amplián-



Figuras 5-8. Microfotografías al M.E.B. de *Nybelinia lingualis*. 5: aspecto general del escólex, lateral; 6: detalle en visión frontal de la región anterior o *pars bothridialis* y base de las trompas; 7: detalle de los ganchos dispuestos helicoidalmente; 8: cubierta de microvellosidades (microtricas) localizadas en el margen de los botridios. Abreviaturas, BO: botridia; G: ganchos; TR: trompas. *Figures 5-8. S.E.M. microphotographs of Nybelinia lingualis*. 5: general view of the scolex, lateral; 6: frontal detail view of the *pars bothridialis* and base of the proboscis; 7: detail of the helicoidally placed hooks; 8: microvilli coverage in the edge of the botridia. Abbreviations, BO: botridia; G: hooks; TR: proboscis.

ampliándose con dicho trabajo el rango hospedador de este parásito. El hallazgo de *N. lingualis* en *O. vulgaris* aporta un nuevo registro hospedador para el Índice Catálogo de Zooparásitos Ibéricos (CORDERO, CASTAÑÓN Y REGUERA, 1994).

Por otro lado, el análisis mediante M.E.B. ha proporcionado una información adicional de gran valor taxonómico para la correcta diagnosis de *Phyllobothrium* sp. La enorme variabilidad morfoanatómica intraespecífica que caracteriza a las formas larvales de este género ha constituido siempre un grave problema taxonómico (WILLIAMS, 1968; STUNKARD, 1977). En muchos casos se han utilizado los caracteres morfoanatómicos intraespecíficos del escólex y la categoría taxonómica del hospedador para identificar un buen número de morfoti-

pos larvales. El estudio morfológico comparado como resultado de la observación al M.O. y M.E.B. de las dos formas larvales examinadas se centra exclusivamente en la estructura de la *pars bothridialis*. Para los cestodos tetrafilídeos la variabilidad morfológica en el grado de plegamiento de los botridios y su microtopografía (microtricas), son los dos caracteres taxonómicos que mejor revelan las ventajas de las técnicas de M.E.B. Mediante el estudio a M. O. de montajes semipermanentes o permanentes de los parásitos en resinas naturales o sintéticas se obtienen imágenes bidimensionales o sobre un plano en las que se hace imposible el estudio espacial o de relieve de las estructuras del escólex.

El estudio al M.E.B. no sólo ha permitido el estudio morfológico comparado y

la observación de una fuerte similitud fenotípica entre la cestodofauna de *O. vulgaris* en aguas de Galicia y el morfotipo III de *Phyllobothrium* sp. descrito por Stunkard (1977) y Shukhgalter (1986), sino también la consecución de un nuevo carácter de diagnóstico mediante el estudio microtopográfico y la observación de las microtricas en la superficie del escólex. Asimismo, en el estudio de la armadura de las trompas de Tentaculariidae ha sido necesario la observación al M.E.B., fundamentalmente en lo que concierne a la disposición de la armadura

basal y metabasal, así como el número y longitud de las filas de ganchos y la longitud de los intervalos entre filas, caracteres de diagnóstico difícilmente apreciables en M. O.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al CACTI-Universidad de Vigo la gran ayuda prestada en la obtención de las fotografías al M.E.B. Este estudio ha sido financiado por el Proyecto CICYTMAR 95-1919-C05-03.

BIBLIOGRAFÍA

- BAKUS, R. H., HAEDRICH, R. L. Y ROBINSON, B. H., 1977. Atlantic mesopelagic zoogeography. *Memories Sears foundation Marine Research*, 1 (7): 266–287.
- BOYLE, P. R., 1990. Cephalopod biology in the fisheries context. *Fisheries Research*, 8: 303–321.
- CORDERO, M., CASTAÑÓN, L. Y REGUERA, A., 1994. *Índice Catálogo de Zooparásitos Ibéricos*. Universidad de León. 650 pp.
- CUÉNOT, L., 1927. Contributions à la faune du Bassin d'Arcachon. VI. Argulides. Description d'*Argulus arcassonensis*, nov. sp. *Bulletin Station biologique Arcachon*, 14: 117–127.
- DOLLFUS, R. P., 1936. Cestodes des invertébrés marins et thalassoides. En C. Joyeux, C. and Baer J. G. (Eds), *Faune de France: Cestodes. Collection honorée de suventions de L'Academie des Sciences de Paris*. 30: 509–539.
- DOLLFUS, R. P., 1958. Copépodes, Isopodes et Helminths parasites de Céphalopodes de la Méditerranée et de l'Atlantique Européen. *Faune marine des Pyrénées-orientales*, 1: 61–72.
- DOLLFUS, R. P., 1964. Énumération des cestodes du plancton et des invertébrés marins. (6^o contribution). *Annales de Parasitologie Humaine et comparée*, 39: 329–379.
- EUZET, L., 1959. Recherches sur les cestodes tetrathyllidés des séliaciens des côtes de France. *Thèse Faculté de Sciences de l'Université de Montpellier*, 1956. Causse, Graille et Castelneau, Montpellier, n^o 140: 1–266.
- FAO, 1994. Yearbook annuaire. *Fishery Statistics*. Vol. 77.
- GUERRA, A., 1992. *Mollusca, Cephalopoda*. En: Ramos, M. A. et al. (Eds). *Fauna Ibérica*. Vol. I. Museo Nacional de Ciencias Naturales, CSIC. Madrid: 327 pp., 12h. lám.
- HANLON, R. T. Y FORSYTHE, J. W., 1985. Advances in the laboratory culture of octopuses for biomedical research. *Laboratory Animal Science*, 35 (1): 33–40.
- HOCHBERG, F. G., 1990. Diseases of Mollusca: Cephalopoda. En Kinne, O. (Ed.): *Diseases of Marine Animals*. Vol. III; Cephalopoda to Urochordata. Biologisches Anstalt Helgoland, Hamburg: 47–227.
- MARGOLIS, L., ESCH, G. W., HOLMES, J. C., KURIS, A. M. Y SCHAD, G. A., 1982. The use of ecological terms in parasitology (report of an ad hoc committee of the american society of parasitologists). *Journal of Parasitology*, 68 (1): 131–133.
- MAYR, E., 1969. *Principles of systematic zoologist*. New York: Mc Graw-Hill. 475 pp.
- PASCUAL, S., 1996. Los sistemas Hospedador-Parásito en la pesquería de Omastriídeos de Galicia. *Tesis Doctoral*. Universidad de Vigo, 167 pp.
- PASCUAL, S., ARIAS, C. Y GUERRA, A., (en prensa). First record of the Trypanorhynchidean parasite *Nybelinia lingualis* Cuvier, 1817 in the squid *Todaropsis eblanae* (Cephalopoda: Omastrophidae). *Scientia Marina*.
- PASCUAL, S. Y GUERRA, A., (en prensa). Is there a squid in your future? a vexing question in Parasitology. *International Journal for Parasitology*.
- PASCUAL, S., GESTAL, C., ESTÉVEZ, J. M., RODRÍGUEZ, H., SOTO, M., ABOLLO, E. Y ARIAS, C., 1996. Parasites in commercially-exploited cephalopods (Mollusca, Cephalopoda) in Spain: an update perspective. *Aquaculture*, 142: 1–10.
- PASCUAL, S., GESTAL, C., SOTO, M., ABOLLO, E., RODRÍGUEZ, H., ESTÉVEZ, J. M. Y ARIAS, C., 1996. Host range and biogeography of cephalopod parasites: an overview. IV *International Symposium Cephalopods-Present and Past*. 141.
- QUINTEIRO, P., 1990. Helminths parásitos de peces de las costas gallegas. *Tesis doctoral*. Universidad de Santiago de Compostela, 145 pp.

- RUDOLPHI, C. A., 1819. *Entozoorum Synopsis cui Acedunt Mantissa Duplex et Indices Locupletissimi*. Berolini. (Citado en Hochberg, 1990).
- STUNKARD, H. W., 1977. Studies on tetraphyllidean and tetrarrhynchidean metacestodes from squids taken on the New England coast. *Biological Bulletin of the marine biological Laboratory*, Woods Hole, 153: 387-412.
- SHUKHGALTER, O. A., 1986. The Argentine squid, *Illex argentinus*, as an intermediate host in cestode life cycles. En: *6th All-Union Conference on Commercial Invertebrates. Abstract of Proceedings, Sevastopol*: 352-353. (Traducción disponible por Hochberg).
- VAULLEGEARD, A. C., 1899. *Recherches sur les tétrarhynqués*. (Citado en Hochberg, 1990).
- VAULLEGEARD, A. C., 1901. Sur les tétrarhynqués de la collection helminthologique du Professeur Corrado Parona, de Gênes. (Citado en Hochberg, 1990).